

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑪ 特許出願公表
⑫ 公表特許公報 (A)

平5-501543

⑬ 公表 平成5年(1993)3月25日

⑭ Int.CI.*	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	部門(区分)
A 61 K 39/395 43/00 45/00 49/00	C ADU	8413-4C 8415-4C 8415-4C 8415-4C	予偏審査請求 有	3 (2)
G 01 N 33/53 33/535	A	8415-4C		
// C 12 N 9/00	D	8310-2J 8310-2J 7823-4B		

(全 23 頁)

⑭ 発明の名称 診断薬または治療薬の抗体ターゲティング

⑬ 特願 平2-508109

⑬ 翻訳文提出日 平4(1992)6月11日

⑬ ⑭ 出願 平1(1989)12月11日

⑬ 国際出願 PCT/US89/05441

⑬ 国際公開番号 WO91/08770

⑬ 国際公開日 平3(1991)6月27日

⑭ 発明者 ハンセン, ハンス・ジョン アメリカ合衆国、ニュー・ジャージイ・07090、ウエストフィールド、ポイントン・786

⑭ 出願人 イムノメディックス・インコー アメリカ合衆国、ニュー・ジャージイ・07060、ウォーレン、シイー・エヌ・4918、マウント・ペテル・ロード・150

⑭ 代理人 弁理士 川口 義雄 外4名

⑭ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, E S(広域特許), F I, F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許)

請求の回数

1. 診断薬または治療薬を標的部位にターゲティングする方法であって、

(a) 哺乳動物に、ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素接合体を非経口的に注入する段階、但し、前記抗体は標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記抗体-酵素接合体が標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記部位に付着するのに十分な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1倍の診断薬または治療薬を含む複物を形成することが可能であり、前記複物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断薬または治療薬に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、

前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在しない、

前記段階を包含することを特徴とする方法。

2. 前記抗体-酵素接合体中の抗体が、腫瘍、感染もしくは寄生虫疾、フィブリリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化ブラーク、非癌性細胞、または、傷害を受けた正常細胞によって生成されるかまたはそれらに関連する抗原に特異的に結合する、請求項1に記載の方法。

3. 前記抗体-酵素接合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エステラーゼである、請求項1に記載の方法。

4. 前記酵素が、デキストラナーゼ、セルラーゼ、または、グルクロニダーゼである、請求項3に記載の方法。

5. 前記薬剤が診断剤である、請求項1に記載の方法。

6. 前記薬剤が、¹¹³I-503 I₁₃₁I エネルギー範囲で放射するガンマ-放射性の放射性同位元素である、請求項5に記載の方法。

7. 前記薬剤が、磁気共鳴画像増強用の常磁性イオンである、請求項5に記載の方法。

特表平5-501543 (2)

8. 前記薬剤が治療剤である、請求項1に記載の方法。

9. 前記薬剤が、ペーターもしくはアルファー放射性の放射性同位元素、薬物、酵素、ホウ素付加因子、血管拡張剤、サイトカイン、光増感剤、または、放射線増感剤である、請求項8に記載の方法。

10. 前記非経口注入が、体腔内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮膚内、リンパ管内、筋肉内、肺葉内、皮下、または、カテーテル灌流経路によって実施される、請求項1に記載の方法。

11. 前記基質が低分子量化合物である、請求項1に記載の方法。

12. 前記基質が前記薬剤のグルクロニド接合体である、請求項1-1に記載の方法。／

13. 前記基質がポリマーである、請求項1に記載の方法。

14. 前記基質が、デキストラン、アミノデキストラン、カルボキシメチルセルロース、または、ポリペプチドである、請求項1-3に記載の方法。

15. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤接合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン粗体を含み、この粗体に、少なくとも

20. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための二重試験注射剤であって、医薬的に受容可能な滅菌注射用ペヒクル中に、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素接合体を含有する、第1の滅菌注射液、但し、前記抗体は標的部位の少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む薬物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび酵素を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ペヒクルに溶解されている、前記第1及び第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

21. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングする

1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この粗体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デキストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている、請求項1-3に記載の方法。

16. 前記基質-薬剤接合体が非基質性ポリマーを含み、このポリマーに、少なくとも1つの基質オリゴマーが結合され、このオリゴマーに、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されている、請求項1-3に記載の方法。

17. 離離系からの抗体-酵素接合体のクリアランスまたは標的部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項1に記載の方法。

18. 離離系からの基質-薬剤接合体のクリアランスまたは標的部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前記基質-薬剤接合体がさらに、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項1に記載の方法。

19. 前記哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。

ための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、但し、前記抗体は、その標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む薬物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび酵素を妨げる量では内在しない、前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

22. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、酵素、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強

特表平5-501543 (3)

剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項21に記載のキット。

23. 前記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

24. 前記基質-薬剤接合体がさらに、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

25. 段階(a)で提供される前記抗体-酵素接合体が、標的部位に存在する前記抗原に対して特異的な第1の結合部位と、酵素活性を妨害しない、前記酵素上のエピトープに対して特異的な第2の結合部位とをもつ二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントを含み、前記二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントが、前記第2の結合部位で前記酵素に非共有的に結合されて前記抗体-酵素接合体を形成する、請求項1に記載の方法。

26. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射剤であって、

(a) 医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解された、

に、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1と第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

27. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、

ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌注射液、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1と第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

28. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、並び

酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ二重特異性抗体または抗体フラグメントを提供する段階、

(b) ターゲティングに有効な量の前記抗体または抗体フラグメントを、哺乳動物に非経口的に注入する段階、

(c) 前記抗体または抗体フラグメントが標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記局在化抗体が前記酵素に結合して前記抗体-酵素接合体をその場で形成するように、前記酵素の酵素活性有効量を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、

(d) さらに、前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記産物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非

特表平5-501543 (4)

標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、前記段階を包含することを特徴とする方法。

3.2. 前記抗体-酵素接合体中の抗体または抗体フラグメントが、腫瘍、感染もしくは寄生病原、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化ブラーク、非壊死細胞、または、傷害を受けた正常細胞によって産生されるかまたは誘導する抗原に特異的に結合する、請求項3.1に記載の方法。

3.3. 前記抗体-酵素接合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エスチラーゼである、請求項3.1に記載の方法。

3.4. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1個のホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光感増感剤である、請求項3.1に記載の方法。

3.5. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤接合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン粗体を含み、この粗体に、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この粗体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デ

キストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている、請求項3.1に記載の方法。

3.6. 前記哺乳動物がヒトである、請求項3.1に記載の方法。

3.7. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射製剤であって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含有する第1の滅菌注射液、但し、前記抗体または抗体フラグメントは、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記酵素は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第3の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成し、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含む；

る、前記基質-酵素接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、また、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1、第2および第3の注射液を含むことを特徴とする製剤。

3.8. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含有する第1の滅菌容器、

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含有する第2の滅菌容器、並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤

接合体を含有する第3の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、前記第1、第2および第3の容器を含むことを特徴とするキット。

3.9. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光感増感剤である、請求項3.8に記載のキット。

明 脳 優

光明の背景

本発明は、抗体-薬物接合体および別個の可溶性基質-薬剤複合体を用いて、抗体のターゲティング能力を高める方法に関する。ここに、標的酵素は、少なくとも1種の治療剤または診断剤を保持する可溶性基質を、その薬剤を含む薬物に交換するのを試験する。従って、この薬剤は、標的位置に蓄積し、有効な治療ないし診断を行なうことができる。前記の方法は、抗体が選択的に結合できる部位に、あらゆる種類の薬剤を、ターゲティングするのに有効である。その使用の中には、腫瘍、感染病巣、フィブリリン凝血、心筋梗塞、弁膜症細胞、傷害を受けた正常細胞、動脈硬化プラーク、リンパ球自己反応クローニ等の病変化および病巣が含まれる。

抗体もしくは抗体フラグメントを、放射性同位元素、薬剤または毒物に結合させ、それによって、診断用もしくは治療用物質を、腫瘍または病巣部位にターゲティングすることはよく知られている。このような方法を用いる場合の主な障害は、抗体に、十分な量の治療薬または診断薬を負荷することが困難である。

さらに、この高分子の高いアミン含量（大部分、荷電されたアンモニウム基の形で存在する）のために、複合体は、正常吸着に付着することとなり、細胞毒性作用の選択性を損なう。

Revised アメリカ国特許第 4,041,722号は、次の抗体接合体を開示しており、この接合体においては、複数の細胞傷害性薬剤分子が分子量 5,000-500,000の高分子担体に共有的に結合しつつ、この負荷担体は、ペンドントアミンまたはカルボキシル基にランダムに付着することによって、抗体に共有的に結合している。Giles ら、J. Till, Cooper 1981. 4/1:557-576. 1978は、抗原複合体法に有効なその他の抗体結合型細胞傷害性薬剤について開示している。Hill ら、アメリカ国特許第 4,111,711号は、メトトレキセートを負荷したアミノデキストランを抗体に部位特異的に付着させることを開示している。

標的の中性子活性化放射療法は、例えば、Goldenbergら、
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:560 (1984); Esposito ら、
J. Med. Chem., 15:441 (1972); Goldenberg, アメリカ国
特許第 4,332,661号、第 4,311,376号、第 4,361,544号、
第 4,460,457号、第 4,444,744号、第 4,460,459号および
第 4,460,561号、並びに同道の原稿出願であるアメリカ国特

特表平5-501543 (5)

ることであった。さうに冠介なことは、抗体を、治療剤または診断剤で負荷しすぎると、生体の拒絶反応を招き、その抗体複合体の破壊をもたらすことである。

細胞傷害性薬剤を抗体に結合させて目標す治療効果を達成するやり方はよく知られている。例えば、メトトレキセート(MTX)を抗体に結合させると、若干の過剰的細胞毒性が緩和されることが知られている。このような複合体の細胞毒性を、細胞傷害性薬剤の負荷量を増大することによって強化することは望ましい。しかしながら、1個の抗体に、個々の薬剤分子を、多數結合させることは、結局、その免疫活性を低下させることとなるが、一方、その効果は、約10個以上の薬剤分子が負荷されると顕著される。

また、薬剤を高分子担体に結合させ、次に、このものを抗体に結合させるという提案も為されてきた。これは、より多数の薬剤分子を、標的部位に搬送できるという利点を持つ。高分子担体としてポリリジンを用いることが、*U.S. Pat. No. 4,466,861* によって報告されている。この著者らの所見によれば、1個の担体あたり約1-3個のMTXしか結合することができず、免疫反応性は低かった。

許出願第 609,601号 (5-14-8(出願) および第 622,991号
(7-21-8(出願) に記載されており、これらすべての掲示を、
並置として主明細書中に含めることとする。)

前記の参考文献は、特に、ホウ素-10含有付加因子(166:144)を、例えば、カルボラン(例えば、フェニルジアソニウムイオンに結合したもの)と抗体との結合を用いて抗体複合体中に取り込む方法を開示している。この複合体は、比較的小数のホウ素-10原子を取り込むのに好適なものである。通常、10から120個のB-10原子を、免疫反応性や回収能率の量が、受け入れ不可能となるほど低くなる以前に、カルボラン-フェニルジアソニウム複合体を用いて1gGに付着させる。有効な治療のためには、多数のB-10原子を固定部位にターゲティングで当ることが望ましい。

したがって、ターゲティング抗体に治療薬を過剰に負荷することによって免疫反応性を喪失させることなくおよび／又は免疫原性応答を誘発しつつ、十分量の治療薬または診断薬を標的部位に付着することが可能な抗体ターゲティング法に対する要求が引き続き存在している。

特表平5-501543 (6)

発明の目的

本発明の一つの目的は、ターゲティング効率を増強することによって、抗体のターゲティング能力を強調する方法を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、癌、感染病原、または例えば心筋梗塞のようなその他の病原の診断および/または治療に有効な薬剤を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、抗体に高度に負荷する必要なしに、治療薬または診断薬を標的部位に高度に蓄積させることである。

本発明のさらに別の目的は、抗体上にホウ素原子を負荷する必要なしに、無中性子活性化放射線療法用の薬剤および病原に対して有効な治療剤として標的するのに十分多数のホウ素原子を標的にする方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、以下の論述に用らして見れば、当業者には自明であろう。

発明の要約

本発明の上記ならびにその他の目的は、診断薬および/または治療薬を標的部位にターゲティングする方法を提供すること

によって達成されるが、この方法は下記の段階を包含する：

(a) 抗体-酵素複合体のターゲティングおよび酵素活性に有効な量を、哺乳類に非経口的に注入する段階。但し、この抗体は、標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性を持つ。

(b) 抗体-酵素複合体が標的部位に局在し、哺乳類の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、可溶性基質-薬剤複合体を、それが標的部位に付着するのに有効な量を、その哺乳類に非経口的に注入する段階。但し、この複合体は、該酵素によって変換されてその薬剤を含む産物を形成し、この産物が、効果的な治療および/または診断のために標的部位に蓄積する。また、基質-薬剤複合体は、該酵素の基質を含み、少なくとも1種の診断薬または治療薬に結合されている。また、ここに、上記酵素、または、該基質-薬剤複合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、投与経路に沿う非標的部位において、または、該基質-薬剤複合体の生体内分布において、上記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げるほどの量としては、その哺乳類に内在しない。

本発明はまた、前記の方法を実施する際に使用される、は適、

滅菌注入製剤およびキットを提供する。

詳細な説明

従来の技術は、治療薬または診断薬を直接抗体に、または、抗体に結合した蛋白に結合させる方法を示している。薬剤を抗体に結合させることに伴う問題として、架橋結合、免疫反応性の喪失、免疫原性、抗体上への薬剤の不十分な負荷、および標的部位への放薬剤の不適切な付着がある。本発明は、抗体-酵素複合体と、別個の基質-薬剤複合体とを用いることによってこのような問題を解決するものであり、これによって、抗体は、診断薬または治療薬を該抗体上に負荷する必要なしに、目的部位にターゲティングすることができる。

本発明の診断薬または治療薬を標的部位にターゲティングする方法は、先ず、ターゲティングおよび酵素活性に効果的な量の抗体-酵素複合体を哺乳類に非経口的に注入すること、及びその複合体が、標的部位に局在し且つその哺乳類の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過するのを持つこと、によって達成される。本発明方法の次の段階は、標的部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤複合体を、その哺乳類に非経口的に注入することである。この複合体は、その酵素に

より該薬剤を含む産物に変換されることができ、この産物が標的部位に蓄積し効果的な治療または診断を実現する。この基質-薬剤複合体は、少なくとも1種の診断薬または治療薬に結合された該酵素の基質である。

この抗体-酵素複合体の抗体成分は、ターゲティング部分であって、この複合体を、標的部位に存在する少なくとも1つの抗原に選択的に結合させる働きをする。従って、この複合体の酵素成分は、標的部位に局在する。一旦、該ターゲティング複合体が実質的に血流から除去されたならば、基質-薬剤複合体を注入する。この基質-薬剤複合体は、細胞であるほどの僅少量以上の抗体-酵素複合体または同様の作用を持つ内在性酵素と、標的部位に向かう途中で出金ってはならない。

しかしながら、この基質-薬剤複合体が標的部位に達すると、この複合体は、該酵素によって、診断薬または治療薬を含む産物に変換される。この酵素は、基質-酵素複合体の多数の分子またはサブユニットを説明し、多数の産物を標的部位に蓄積しやすい形で遊離する。これは、標的部位と、組織を取りまく体液または標的部位自体に存する他の抗原含有媒体との分配が、蓄積に好都合であるためである。従って、この酵素は、抗体の

特表平5-501543 (7)

ターゲティング能力を増幅するが、薬剤を、ターゲティング抗体に結合させることを必要としない。また、薬剤は、標的部位に蓄積し、そこで診断または治療作用を実施することができる。

別様に断わらない限り、本明細書中「抗体」という用語の使用は、抗体フラグメントを含めること、従って、「抗体／フラグメント」という用語と等しいものであって、この説明では両者は相互に交換的に用いられる。抗体は、いずれのクラスの、例えば、IgG, IgM, IgA, IgD, IgEの免疫グロブリン全體でもよいし、二重もしくは多重抗原またはエピトープ特異性を備えたハイブリッド抗体でもよいし、ハイブリッドフラグメントを含むフラグメント、例えば、F(ab')₂, F(ab')₃, Fc', Fabなどでもよい。

抗体は、抗血清固形物を含み、好ましくは、アフィニティー精製のもので高い免疫反応性をもつもの、例えば、結合定数が少なくとも約10⁷ 1/m²、好ましくは少なくとも約10⁹ 1/m²の免疫反応性をもつもの、高い免疫特異性をもつもの、例えば、少なくとも約40%、好ましくは少なくとも約60%、さらに好ましくは約75-95%の免疫特異性をもつもの、他の組織抗原との交差反応性が低いもの、例えば、約30%以下、好ま

しくは約15%以下、さらには好ましくは約5%以下の交叉反応性をもつものである。この抗体は、通常の方法によって、アフィニティー精製することができる。例えば、抗原を、例えばセファデックスを充填したクロマトグラフィーカラムに結合させ、このカラム中に抗血清を通過させ、それによって特異抗体を保持し、その他の免疫グロブリンや汚染物質を分離除去し、次に、カオトロビック剤による溶出によって精製抗体を回収する、また、必要に応じてさらに精製する。

モノクローナル抗体もまた、本発明方法に使用するに適当であり、それらの高い特異性のために好ましい。モノクローナル抗体は、現在では過例法となつた手順、すなわち、免疫原性抗原製造物での哺乳類の免疫、免疫リソバもしくは脾臓細胞と不死化骨髓細胞との融合、および特異的ハイブリドーマクローニングの単離によって容易に製造される。モノクローナル抗体の、さらに特殊な調製法、例えば、種間融合 (interspecies fusion) や、高度可変領域の、遺伝子工学操作なども排除されない。この理由は、本発明方法の有効性に影響するものは主に抗体の抗原特異性にあるからである。

抗体フラグメントは、例えば、特に、アメリカ国特許第

4,331,641号に開示されている通常の方法によって、免疫グロブリン全體をペプシンもしくはペプシンで消化することによって作ることができる。

標的部位は、癌、感染および寄生病原、フィブリン凝血、心臓梗塞、動脈硬化ブラーク、傷害を受けた正常組織、炎症細胞、およびリンパ球自己反応性クローニングであつてもよいが、それらに限定されない。

腫瘍または、ウイルス性、細菌性、真菌性、寄生生物性感染を含む感染病原によって產生されるかまたはそれらに伴うマーカーに特異的に結合する多くの抗体および抗体フラグメント、並びに、そのような微生物と関連する抗原や底物については、特に、日本なら、アメリカ国特許第 3,927,193号; Goldfarb et al., アメリカ国特許第 4,331,641号、第 4,341,376号、第 4,361,544号、第 4,468,457号、第 4,444,744号。

第 4,460,459号および第 4,460,561号、並びに、関連する底物出願アメリカ国特許出願第 169,607号および第 611,193号に開示されている。これらすべての開示を、参照としてそっくりそのまま本明細書中に含めることとする。

抗フィブリン抗体は、この分野においてはよく知られている。

心筋梗塞を標的する抗体は、例えば、日本なら、アメリカ国特許第 4,331,641号に開示されており、この開示内容を、参照としてそのまま本明細書中に含めることにする。正常組織もしくは器官を標的する抗体は、例えば、アメリカ国特許第 4,715,210号に開示されており、その開示内容を、参照としてそのまま本明細書中に含めることにする。抗フィブリン抗体は、この分野では、動脈硬化ブラークやリンパ球自己反応性クローニングに結合する抗体としてよく知られている。

一般に、抗体は通常、この分野で周知の多數の慣用技術を用いて、いかなる抗原に対しても生じさせることができる。診断的または治療的関心の対象である哺乳類の体内のある部位に十分な濃度で見出される抗原に対して、抗体をターゲティングする方法は、いかなる方法であれ、本発明の方法に使用される抗体-酵素接合体の製造に用いることができる。

さらに、標的部位に存する抗原に対して特異的な少なくとも1つの結合部位と、抗体-酵素接合体の酵素成分に対して特異的な別の少なくとも1つの結合部位とをもつ二重特異性抗体／フラグメントは、本発明方法に用いることができるということにも注目すべきである。このような抗体は注入前に酵素と結合

特表平5-501543 (8)

することができ、これによって酵素を共有序的に抗体に結合させる必要を回避することができる。あるいは、その抗体を注入して、標的部位に局在させ、非ターゲティング抗体が哺乳類の循環系から実質的に除去された後に、局在化した抗体に到達して該抗体と結合するのに十分な量の酵素がその場で(1)(1)(1)抗体-酵素接合体を形成することが可能な量および経路で該酵素を注入することができる。

二重特異性抗体は、様々な過剰法によって作ることができる。例えば、ジスルフィド切断によって、全 IgG の混合物または好みしくは、(1)(1)(1)、フラグメントの混合物の再構成によって、1種以上のクローリンを融合して、1種以上の特異性を持つ免疫グロブリン鎖を生成するポリオーマを形成することによって、および、達伝子工学によって調製することができる。二重特異性抗体は、酵素上の1個以上のエピトープに結合してもよいが、酵素活性を妨げる部位に結合してはならない。

本発明に用いられる酵素は、実質的に可溶な基質-薬剤接合体を変換して、診断剤および/または治療剤を含み標的部位に蓄積する産物を形成することができなければならない。上記酵素および同様の基質特異性を持つ酵素のいずれもが、基質-薬

剤接合体の投与経路または生体分布において、その酵素原にとって内在性であってはならない。さもなければ、その薬剤は標的部位以外の部位で放出され、これは通常、常にそうだというわけではないが、薬剤の診断または治療作用の効率を妨げたり不安定なものにするだろう。

原則として、酵素は、抗体に結合して基質-薬剤接合体を産物に変換できるものであればどのような種類の酵素でもよいが、ただし、これにも前記の注意は適用される。プロテアーゼ類、グリコシダーゼ類、ニステラーゼ類などが、適当な条件で本発明に使用できる一般的種類の酵素のすべてである。適当な酵素のさらに特異的な例としては、グルクロニダーゼ、ベーターグルコシダーゼ、ベーターラクタマーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、フラクターゼ、アミノペプチダーゼ、リゾチームなどであるが、これらに限定されるものではない。

酵素は、選んだ基質-薬剤接合体の種類の構造として選択される。例えば、基質としてデキストランを選ぶことは、酵素としてはデキストラナーゼを使用することと結びつく。同様に、セルラーゼは、セルロース基質と共に使用される。基質-薬剤接合体としてグルクロニドを用いることは、酵素としてグルクロ

ニダーゼを使用することと結びつく、などである。

抗体-酵素接合体をその場で形成する方法とは別に、酵素を抗体に共有序的に結合させることは有利である。すなわち、直接に結合させるか、または、短いもしくは長いリンカー部分を介して、または、抗体および/または酵素上の1個以上の官能基、例えばアミノ基、カルボキシル基、フェニル基、チオール基、ヒドロキシル基を介して結合させることは有利である。通常用いられる各種リンカー。例えば、ジオキシアネット類、ジイソチオシアネット類、ビス(ヒドロキシスクシンイミド)エステル類、カルボジイミド類、マレイミドヒドロキシスクシンイミドエステル類、グルタルアデヒドなどが使用できる。

単純な方法は、グルタルアルデヒドの存在下に抗体と酵素と混合し、抗体-酵素接合体を形成することである。最初の(1)(1)(1)塩基結合は、例えばボロハイドライド還元による第二アミン誘導によって安定化させることができる。この方法は、通常、例えば免疫組織化学やイムノアッセイに使用されるペルオキシダーゼ-抗体接合体の調製に用いられる。ジイソチオシアネットまたはカルボジイミドを、グルタルアルデヒドの代わりに用いてもよい。

さらに選択的な場合は、異種二官能性リンカー、例えばマレイミドヒドロキシスクシンイミドエステルを用いて形成できる。このものと酵素を反応させると、その酵素上にアミノ基を誘導する。この因導体は、さらに、例えば過酸スルフヒドリル基を持つ抗体(1)(1)(1)フラグメント(または、もっと大きなフラグメントもしくは無傷の免疫グロブリンで、それらに、例えば(1)(1)(1)試薬によってスルヒドリル基を結合させたもの)と反応させることができる。

酵素を、抗原結合部位よりはるかに離れた部位で抗体に結合させるのが有利である。このことは、例えば、前記したように、切断された側面スルフヒドリル基に対する結合によって形成される。もう一つの方法は、あらかじめ炭水化物部分を酸化した抗体を、少なくとも1個の過酸アミノ基を持つ酵素と反応させることである。これによって、最初の(1)(1)(1)塩基(イミン)結合が得られる。この結合は、例えばボロハイドライド還元により第二アミンに還元して安定化し、最終接合体を形成するのが好ましい。

接合体の大きさの問題のため、普通は、1個の抗体を1個の酵素分子に結合させるのが好ましい。しかしながら、数個の抗

特表平5-501543 (9)

体フラグメント、例えば $\text{F}(\text{ab})_2$ もしくは $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントを單一の酵素に結合させて、抗原標的に対する、その結合親和性または結合効率を増大させることも有利であろう。あるいは、酵素があまりに高いものでない場合には、複数の酵素分子を單一の抗体もしくは抗体フラグメントに結合させて、接合体の代謝回転を増し、標的部位における診断剤または治療剤の付着速度を増進させることが有用であろう。1種以上の酵素と抗体との接合体もまた、それが標的部位に到達することができ、あまりに迅速に除去されない限り使用できる。様々の大きさの接合体混合物、または、複数体を含む接合体もまた、以前に記した注意が守られる限り使用できる。

さらに、抗体-酵素接合体を、放射性同位元素または磁気共鳴画像増強剤で標識したり、それらに結合させたり、または、接合できるように改変したりすることもできる。これによって、哺乳類の腫瘍英からの該接合体のクリアランスを監視したり、基質-薬剤接合体の投与前に、該接合体が標的部位に十分局在しているかどうかを確かめることができる。あるいは、その接合体に、標識、例えば放射性標識、蛍光標識などを付加することもできる。これによって、血液や尿のような体液中に該接合

体を検出したり、定量したりすることが可能となり、したがって、ターゲティングおよび/またはクリアランスを測定および/または推定することが可能となる。

in vivo 使用のために蛋白質を標識するのに適当な通常の放射性標識法のいずれもが、一般に、抗体-酵素接合体を標識するのに好適であり、また、基質-酵素接合体を標識するにも好都合であることが多い。このことについては下記に述べる通り、これは、例えば I-131, I-123 よる直接標識によって、例えば $\text{I}-\text{IgG}$ または Cu^{2+} などによる金属化によって、借用技術によって、または、放射性金属もしくは常磁性イオンに対するキレート剤を結合することによって達成できる。そのようなキレート剤、および、その抗体への結合方法は、当業者にはよく知られており、並びに、特に、例えば前記 Goldfarb の特許および $\text{I}-\text{IgG}$ なら、J. Biol. Med., 26:293 (1985) に開示されている。

基質-薬剤接合体は基質を含み、この基質は抗体-酵素接合体に局在する酵素によって薬物に変換され得る。薬剤は診断剤または治療剤であって、ある特定部位にたいする薬剤ターゲティングは、その効能にとって有利となろう。そのような治療剤

および診断剤は、例えば酵素、抗生物質もしくは化学療法剤、放射性同位元素、常磁性イオン、ホウ素付加因子、サイトカイン、光増感剤、放射増感剤、血管拡張剤などである。

基質-薬剤接合体は、投与および標的部位への搬送のために可溶性でなければならない。さらに、このものは標的部位に達し、接合体よりも、その部位に誘引されるのに実質的により好ましい分配係数をもつ薬物に変換されなければならない。本明細書中で使用する「可溶性」という用語は、接合体が液体中に投与され、その液体によって標的部位に運搬される該液体中に、診断的または治療的に有効量の接合体を標的部位に運搬させるに十分な程度に溶解し得るという意味である。一般に、投与は静脈内または動脈内点滴によって血液中に行なわれ、接合体は血液に溶解し、好ましくは、血液の水相によってほとんど運ばれるほど十分な親水性を持ち、比較的容易に血管壁を通過して細胞間液に拡散することが、そのようなことが必要な場合には、望ましい。

もちろん、標的部位が循環系中にある、心臓画像化または動脈硬化ブラークの画像化もしくは治療等の場合には、水溶性/脂溶性は、基質-薬剤接合体が酵素によって切断されて、標的

部位により好適に分配することに伴う血清可溶性の低下などには重要ではない。本発明のターゲティング機構を特徴づけるものは、まさに該薬剤からのこのような分配であって、一旦、基質-薬剤接合体がターゲティング抗体-酵素接合体の酵素成分によって作用されると、その薬剤は、基質-酵素接合体が酵素のない場合に累積するよりもかなり大量標的部位に累積する。そのように薬剤の切り離しが行なわれることである。

これについては、いくつか的一般的な例や、様々の薬剤についてのさらに詳細な説明に用らしてみれば、さらに分かりやすいであろう。

本発明の基質-薬剤接合体の一般的な製造方法は、少なくとも1種の治療剤または診断剤を基質に共有的に結合させることを包含する。

抗体療法に有用な、ある種の細胞傷害性薬剤は、比較的血清に不溶である。非接合体のものにはまったく有毒であるものもあるが、接合体に変換すると毒性が相当に減少する。比較的難溶性の薬剤をより可溶性の接合体、例えばグルクロニドに変換することは、血液の水相に対するその溶解性を増し、静脈、動脈、毛細血管の細胞壁からの透過性を高め、組織を取りまく

特表平5-501543 (10)

細胞間液への到達を向上させる。実際、ある種の有害物質、例えば芳香族もしくは脂環式アルコール類、チオール類、フェノール類、アミン類のような物質を肝臓においてグルクロニド環に変換することが、それらの物質に対する生体の解毒法であり、それによって尿中に排泄しやすくなる。

薬剤はグルクロン酸に結合され、グルクロニドを形成し、これが複合体を溶解する。結合は、通常、薬剤のヒドロキシル基、チオール基またはアミン基に対して行なわれ、このグルクロン酸のアルデヒド基と、アセタール、チオアセタール、アミノアセタールを形成する。この複合体は、標的部位において、抗体-酵素複合体の酵素成分である酵素グルクロニダーゼによって切断される。次に、この逆離薬剤は細胞間液にはほとんど不溶になり、周囲の細胞の細胞膜に付着し易くなり、その抗体-酵素複合体局在部位において細胞傷害性作用を発揮する。

このようなグルクロニド環を調製する一つの方法は、哺乳類例えばウシ、ヤギ、ウマ、または、靈長類に、該薬剤を注入することである。薬剤のあるものは、動物の肝臓でグルクロニド環に変換され、この薬剤-グルクロニド複合体は尿中に排泄される。この薬剤は、肝動脈または門脈からの、肝臓ポンプによ

る緩慢な膀胱内点滴で投与されることが好ましい。次に、尿の採取と、グルクロニド複合体の抽出は、例えばイオン交換クロマトグラフィーによって実施できる。また、別法として、UDP-グルクロン酸を酵素と反応させ、次に、グルクロニドを反応混合物から単離するやり方がある。この反応は、哺乳類肝臓の小胞体から単離した酵素の触媒下に実施できる、および/または、この反応は、その小胞体の抽出物もしくはホモジネートの存在下に実施することができる。

そのような基質に変換できる抗腫瘍薬の一環類が、エビルビシンすなわちドキソルビシンの4'-エピマーであるが、これは、アントラサイクリングリコシドであり、ヒトターローグルクロニダーゼ (Arachis, Canna, 1981, 45:5815, 1985) の基質であることが判明している。それより極性基の少ないその他の類似体がさらに脂溶性が高くなることが期待され、このような方法にはずっと大きな成績が見込まれる。その他の薬剤、酵素、ホウ素化合物、または、芳香族もしくは脂環式アルコール、チオール、アミン基を持つキレート剤も、このような複合体形成の候補となる。

基質-薬剤複合体の別の種類は、ポリマー主鎖に沿って折線

的に複数の薬剤を結合させたポリマーである。このポリマーは、抗体-酵素複合体の酵素成分に対する基質であってもよいし、または、そのような酵素の基質となるセグメントもしくは分枝を含むものであってもよい。薬剤分子は、該ポリマーに次のように結合される。すなわち、酵素による切断により、ポリマー単位から遊離する該薬剤、または、必要な程度の低い溶解性をもつか、若しくは標的部位の細胞、組織、組織成分などの場所を取りまく液体と比較してそのような場所への分配係数がより好適であるほどに十分少ない数の該単位に結合された該薬剤が切り離されるように結合している。

このように使用されるポリマーの例としては、例えば、ポリオール類、多糖類、ポリペプチド類などが挙げられる。多糖類の一例は、デキストラン、すなわちアルファーグリコシドであって、これは酵素デキストラナーゼで切断される。診断剤または治療剤は、デキストランのヒドロキシル基に感受性を持つ反応基、例えば脱水物類、イソシアネート類、イソチオシアネート類などを含むように官能化することができる。あるいは、デキストランを、いくつかのやり方で、例えばアミノデキストランに変換することによって官能化することもできる。

アミノデキストラン (AD) 単体を含む基質-薬剤複合体の製造法は、通常、デキストランポリマー、育剤には、約 10,000-100,000 の平均分子量 (M.W.)、好ましくは約 10,000-10,000、さらに好ましくは約 15,000 の平均分子量を持つデキストランを開始物質とする。次に、このデキストランを酸化剤と反応させ、その炭水化物類の一部を酸化してアルデヒド基を形成する。この酸化は、糖分解性試薬、例えば I:10₁ を用い常例法によって行なうのが都合がよい。

酸化剤の量は、M.W.が約 10,000 のデキストラン 1 個に対して、約 5.0-15.0、好ましくは 10.0 個のアルデヒド基が生成するように、同時にまた、他の M.W. デキストランに対してもほぼ同じ割合のアルデヒド基が生成するように、調整するのが都合である。後にアミン基となるアルデヒド基の数が多くなるのは、該ポリマーがその後ポリリジンのような導助をとり、同時に酵素切断に対して抵抗性を示すために、不都合である。これより数が少なくなると、薬剤、酵素、キレート剤、または、ホウ素付加因子の負荷量が所望の値を下回ることになり、これは、特に、酵素の代謝回転数が低い場合は不利である。

次に、この酸化デキストランを、ポリアミン、好ましくはジ

特表平5-501543 (11)

アミン、さらに好みしくはモノーもしくはポリーヒドロキシジアミンと反応させる。適当なアミンとしては、例えばエチレンジアミン、プロピレンジアミンもしくは四様のポリメチレンジアミン類、ジエチレントリアミンもしくは類似のポリアミン類、1、3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンもしくはその他の類似のヒドロキシル化ジアミン類もしくはポリアミン類などが挙げられる。アルデヒド基に対して、過剰なアミンを使用し、アルデヒド基のほとんど全てを、確實に、S-1111基（イミン）基に変換する。

得られた中間体の還元安定化を、この S-1111 基中間体を還元剤、例えば NaBH_4 、 NaBH_3Cl などと反応させて実現することができる。過剰の還元剤を使用して、このイミン基のほとんど全てが、確実に、第二アミンに還元されるようにし、また、未反応のアルデヒド基があれば、これをヒドロキシル基に確実に還元する。得られた付加物はさらに、通常のふるい分けカラム中を通過させ、架橋結合デキストランを除去して精製することができる。AD 上に生じた第一アミノ基の数は、秤量したサンプルをトリニトロベンゼンスルファン酸と反応させ、420 nm での光学密度を標準物質を用いて補正することにより推定

できる。この方法により、通常ほぼ完全に、アルデヒド基の計算数が、AD 上で第一アミノ基に変換される。

あるいは、デキストランを通常塩により調導化し、アミン基を導入することもできる。例えば、真化シアンと反応させ、次に、ジアミンと反応させててもよい。

AD は、ある特定の薬剤、毒素、キレート剤、または、ホウ素付加因子の調導体で、その活性形、好みしくはカルボキシル基活性化調導体と反応させなければならない。この活性形は、通常の手段、例えばジシクロヘキシルカルボクシミド (DCC) または水溶性のその変形体を用いて調整される。

メトトレキセート (MTX) が、本発明の調導体を調導する場合に用いられる典型的な薬剤であるが、これは、本発明手段の一つを例示するのに用いられる。その他の薬剤、毒素、キレート剤、ホウ素付加因子に対して、既述の手段が適当な変更を加えて用いられるが、このような変更は、当業者には自明のものであろう。MTX の活性化は、DCC のような通常の任意のカルボキシル活性化試薬で都合よく実施できる。必要であればその後で、N-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) と反応させ、活性化エステルを形成する。この反応は通常、極性、

非プロトン性溶媒、例えばジメチルフォルムアミド (DMF)、ジメチルスルフォキシド (DMSO) などの中で行なう。その他の活性化エステル、例えば $\text{P}-\text{ニトロベンゾエート}$ なども、混合脱離水物と同様、使用することができる。DCC/HOSu 活性化は極やかであり、活性化 MTX は、水溶液中で AD と反応させることができるので好みしい。

AD に対する活性化 MTX の割合は、AD 上に存在するアミノ基の約半分が反応して、活性化 MTX のカルボキシル基とアミド結合を形成する程度のものであることが好みしい。したがって、約 100 倍のアミノ基が、開始時 MW が約 40,000 の AD 上にあるならば、この内の約 50 までが活性化 MTX と反応しなければならない。約 50:1 MTX:AD の比を用いるならば、通常、約 2.5-5.0 倍の MTX 分子を導入する。これより負荷を高くするには難しく、これは、その不溶性が増すために、付加物が沈殿し始めるからである。

その他の薬剤に用いられる応用例として、5-フルオロウラシル (5-FU) による負荷を擧げるなら、これは、5-フルオロウリジンを、炭水化物部分を例えば過ヨウ素酸塩を用いて酸化し、この中間体をアミノデキストランと反応させ、さらに、

この S-1111 基付加物を還元的に安定化することによって実現できる。シクロヘキシミドは、次のようにして負荷することができる。すなわち、そのシクロヘキサンのカルボニルをアミノデキストランのアミノ基と直接反応させ、その後、還元的に安定化させることによって、あるいは、その衍生物ヒドロキシルを過剰のジイソチオシアネートリリンカーと反応させ、かつ、そのイソチオシアネート調導体をアミノデキストラン上のアミンと反応させることによって、あるいは、イミド蜜素を例えばハロ酸もしくはハロエステルと反応させ、その後、得られたカルボキシル調導体を例えば DCC と反応させ、かつ、アミノデキストラン上のアミンと結合することによって、負荷することができる。

もう一つの例は、抗生素マイトマイシン C と、その類似体から得られる。この分子は、アミノ基と環状イミンを持つが、そのいずれかを、アルキル化活性化基例えばスクシンイミジルオキシド酢酸、または、スルフォスクシンイミジルオキシ (4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート (スルフォ-SIA) と反応させることができる。次に、得られた中間体を用いて、アミノデキストラン上のアミノ基をアルキル化する。別途とし

て、カルボキシル基を例えれば炭水コハク酸を用いて導入し、次に、例えは DCC を用いて活性化し、この活性化中間体は前記と同様に結合させる。

通常、例えはアメリカヤマゴボウ抗ウィルス蛋白質 (PAP) もしくは、リシン A 種などは、グルタルアルデヒド結合によつて、または、該蛋白質上の活性化カルボキシル基をアミノデキストラノン上のアミンと反応させて、結合することができる。

上に挙げた特許例以外にも、腫瘍細胞や、ヒトに感染して病気の原因となる微生物に対して細胞傷害性作用を持つ薬物および毒素はたくさん知られている。そのようなものは、薬物や毒素の解説書、例えはメルク・インディックスなどに見ることができる。このような薬物はいずれも、この分野には周知の、また、前記のものとの類似から導思される通常法によって、AD 上に結合することができる。本発明に従えば、ある薬物を複合体として、その構造中に部分的にまたは完全に無毒化できるといふことは、その薬物の全身性副作用を軽減し、半胱氨酸の薬物の全身投与が受け入れられない場合でもその使用を認めることができる。例えは、MTX とシクロヘキシミドは、全身的に投与した場合、毒性が強すぎることが多い。本発明に従うな

らば、基質粗体に結合されたこの薬物のさらに多数分子を投与しても、それは、全身性の毒性を緩和するばかりか、治療さえ可能にする。

基質粗体上への薬剤の負荷は溶解性 (標的部位を満す液体と、標的細胞、組織またはその他の構造、例えは動脈硬化ブラーク、フィブリリン凝血、ウィルス粒子、寄生生物などとの間の分配係数) に、また、基質分子もしくはサブユニットを酵素切断して、所望の治療作用を発揮するのに十分好適な標的への分配係数をもつ薬物を含ませる効率に、依存するであろう。一般に、薬剤をデキストラノン上に負荷するのは、単離サブユニット対薬剤の比が約 3 ~ 約 5 となるようにするのが望ましい。もっともこれはそうするのが望ましいのであって、限定的な量ではない。薬剤分子の負荷が過大になると、酵素活性を阻害することがある。これは、主に、基質複合体が酵素の活性化部位に結合するのを妨げる立体障害によって起こる。負荷が過小であると、酵素切断の結果として得られる薬剤の液体溶解性低下が、十分に行なわれることがある。これは、薬剤 (恐らく、まだ、2 ~ 3 のグリコシドサブユニットがそれに結合している) の溶解性を低下させるのに十分なほどの複サブユニットが切断遊離される前

に、多糖類 - 薬剤複合体の小部分が結合酵素から逃れて放出してしまうからである。すなわち、その薬剤が周囲の液体から部分よく分配されて、標的部位、例えは腫瘍細胞膜、細胞細胞壁、動脈硬化ブラーク、または、フィブリリン凝血などに集積するほど十分に、その溶解性が低下しないからである。毒素は、大蛋白質であることが多いために、薬剤よりも負荷量を減らし得る。

放射性金属用のキレート剤または電気共鳴増強剤も、この分野では、よく知られている。典型的なものは、エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) およびジエチレントリアミンベンタ酢酸 (DPTA) の誘導体である。これらは、通常、側鎖に官能基を持ち、これによって、このキレート剤は粗体に結合される。この同じ基を用いて、キレート剤を AD 上のアミン基に結合する。あるいは、キレート剤上のカルボキシル基またはアミン基を結合させ、AD 活性化をもたらすか、または、あらかじめ活性化を行い、次に結合を行なう。これらはいずれも既知の方法で行なうことができる。例えは、G-11 のキレート剤であるデフェロキサミンは遊離アミン基を持つ。このアミン基は、適当なリンカーで活性化されて活性化カルボキシル、イソチオシアネートなどの基を含むこととなり、さらに、AD 上のアミ

ンに結合する。キレート剤を AD のアミンに結合させるその他の方法は、キレート剤の官能性に依るが、当業者には自明であろう。

ホウ素付加因子 (111111)、例えはカルボランは、基質複合体に結合され、抗体によって病原にターゲティングされた場合、熱中性子放射によって活性化され、放射性原子に変換される。この原子はアルファ放射によって崩壊し、きわめて細胞傷害性の強い局部作用をもたらす。ホウ素付加因子を高度に負荷することは、電気共鳴増強イオンと同様、その作用を強化するのにきわめて重要である。カルボランは、本分野においてはよく知られているように、ペンドント側鎖上のカルボキシル基を用いて作られる。このカルボランを、カルボキシル基の活性化および粗体上のアミンとの結合によって AD 上に結合させることにより、有用な基質 - 薬剤複合体の調製が可能である。

本発明の一実施形態においては、基質 - 薬剤複合体は多数のホウ素原子を含むが、さらに好ましくはホウ素 - 10 同位元素に富む試薬から調製するのがよく、約 8.6% ホウ素 - 10 に富むホウ素含有量が市販されている。このような複合体は、中性子活性化放射線 β 放射法においてはきわめて有用である。なぜ

なら、これによって腫瘍部位または病巣部位に十分な数のホウ素原子をもたらし、熱中性子照射の際に標的組織にアルファ粒子の治療量を提供することが可能になるからである。しかも、これは、標的組織に局在する抗体-酵素接合体の投与量のパーセントが比較的低い場合例えば1-10%でも実現可能である。このような局在パーセントは、抗体-標的化種 (antibody-targeted species) にとってはそれほど珍しいことではない。

本発明のホウ素負荷基質接合体は、基質分子あたり多数のボロン原子を持つ。これは、通常、少なくとも約50から約10,000個、好ましくは約200から約2,000個である。繰り返すと、これらは、天然存在量20%のホウ素-10同位元素を含むもっと多数のホウ素原子を持つ接合体を使用する方がコスト的に有利であるが、好ましくは約9.6%のホウ素-10に富むものであることが望ましい。

基質-薬剤接合体は、ホウ素を含まない部分、または、ホウ素とその他の有用な基とを含む部分を備えるものであってもよい。このような基は例えば、核種、特にI-123, I-125, もしくはI-131、または、機能基團例えばキレート剤、金属イオンを

含むキレート、薬剤、糖素、発色団、発色基、蛍光マーカーなどであり、これらはいずれも、その治療効果を増したり、ホウ素付加因子の付着および/またはクリアランスの監視を可能にしたり、補助的な治療作用を行なうものである。基質-薬剤接合体には機能基團を取り込んでもよく、その主要目的は標的性を増したり、ホウ素付加因子を含む酵素切断基物の水溶性を増したりすることにある。

このような接合体を作るにあたって、ホウ素のかご型化合物を用いると便利であるが、これは、比較的取扱いやすいこと、また、そのようななかで型化合物の各々が、5-12個のボロン原子を標的部位に導みきことができるこによる。当業者ならば、以下に論じる反応の多くについて、この分野における一般的な参考文献を知ることができるであろう。中でも、もっとも良く、もっとも包括的なのは、Mettlerら、「Polyborene Derivatives」(Dekker, New York, 1968); Mettlerら、「Boron Hydride Chemistry」(Academic Press, New York, 1975); Grimes, 'Carboranes', (Academic Press, New York, 1970) である。上記文献には、複数のホウ素原子を含む有機物等の合成という広範な主題範囲内で特定テーマについて豊富

な文献が含まれている。 Rivkin等、アメリカ国特許出願第7,411,616号、(6-7-85出願) にも詳細が載っており、この出願を参照として、そのまま本明細書中に含めることにする。

デキストランやアミノデキストランのようなアルファーグリコシドに代わるものとして、カルボキシメチルセルロース(CMC)のようなペーターグリコシドがある。これはセルラーゼ酵素によって切断される。このCMCに診断剤または治療剤を結合させる方法はデキストランの場合と同じであるが、その理由は、両方とも強ポリマーであり、グリコシド結合の立体化学が異なるだけだからである。CMCから付加的機能分子を削除することは、CMCをカルボジイミド型の結合剤と反応させ、診断剤または治療剤上のアミノ基を用いてアミド結合を形成させることによってもっとも好都合に達成されるであろう。あるいは、グリコール切断試薬例えば過ヨウ素酸塩で緩やかに酸化し、ポリマー鎖上の複数の部位にアルデヒド基を形成させ、次いでジアミンと反応させれば、様々な官能基と反応させるのに都合のよいアミノCMCを形成することができる。この酸化CMCをアミンと結合し、水素化ホウ素による安定化を図ることも実施可能である。薬剤をCMCに結合させるその他の手段

については、当業者には自明であろう。

ポリマー基質におけるさらにもう一つの変形体は、酵素で切断されないが、酵素の基質となるオリゴマーの短いリンクセグメントを有し、かつ、薬剤、キレート剤、ホウ素付加因子、類似の診断剤もしくは治療剤を有する、ポリマーである。一つの例として、ポリビニールアルコールを、複数の短いオリゴサッカライド例えば短いデキストランやセルロースオリゴマー(これらは、例えば5-50個、好ましくは5-20個のグリコシドサブユニットからなる。)用の担体として用いることができる。ポリビニールアルコールを、例えば臭化シアンでアミノ化し、次いでクアミン結合してもよい。オリゴサッカライドは、例えば過ヨウ素酸塩で緩やかに酸化し、アミノ化ポリマーで結合して ==== 塩基結合を形成し、これを好ましくはさらに、水素化ホウ素還元によって安定化させる。次に、得られたオリゴマー結合ポリマーを、デキストランポリマーやセルロースポリマーについて前述したように短くアミノ化してもよいし、または、そうでなければ通常の方法で官能化し、各オリゴマーリンカー上に少なくとも2個、好ましくは約2-5個のアミン基を結合させる。次に、平均約1-3個の薬剤分子、キレート

剤、ホウ素付加因子、その他の薬剤をこのオリゴマーの各々に結合させる。

他にもたくさんの変形体が考えられることは自明であろう。軽く酸化されたデキストランオリゴマーリンカーをアミン化ポリマーおよび薬剤もしくはその他の薬剤に結合することは同時に行なってもよいし、通常的に行なってもよいが、その後に安定化する。薬剤上の他の官能基を用いて、オリゴマーに結合してもよいし、また、その他の官能基を用いてオリゴマーをポリマー粗体に結合させてもよい。

アクリル酸ポリマーを用いてもよいが、この場合、アクリル酸カルボキシルをカルボジイミドで活性化することによって形成されたアミド結合により、アミノデキストランオリゴマーをそのポリマーに結合させる。ポリペプチドを用いてもよく、この場合、粗体上のカルボキシルまたはアミン残基にオリゴマーリンカーを結合させる。オリゴサッカライドリンカーの代わりに、短いポリニステルもしくはリゴペプチドリンカーを用いてもよく、この場合、そのリンカーを切断するエステラーゼもしくはペプチダーゼ酵素を含有させる。当業者ならば、本発明の広範な範囲内に含まれ、かつ、通常の合成法によって調製でき

る他の変形体を予見できるであろう。

さらに別のアプローチは、次のような粗体ポリマーを用いることである。すなわち、薬剤、キレート剤、ホウ素付加因子またはその他の薬剤を保持し、かつ、失活剤の形では、標的に対し強い親属性を持つが、その後結合による失活受けて、基質分子を可溶化し、その分子はターゲティング酵素によって切断される、ポリマーである。このような基質-薬剤接合体に関する別種の一例はポリリジンであり、そこに、複数の放射性金属もしくは常磁性金属キレート剤、カルボランまたはMTX分子を結合させたものである。次に、この粗体接合体を、複数の短いデキストランオリゴマーと、例えば  糖基形成によって結合し、軽く酸化されたデキストランを形成し、水素化ホウ素安定化を行う（もしキレート剤が粗体に結合されているならば、その後、放射性同位元素もしくは常磁性イオンを負荷する）。これを、ポリリジンの溶解性を増し（「粘着性」を減らし）、それを血液中で運搬しやすいように、また、毛細血管を通過しやすいようにする比率で行なう。標的部位、例えばある腫瘍において、局在する抗腫瘍抗体-デキストラナーゼ接合体は、このポリリジンからデキストラン被覆を、それが再び「ねばねば

になる」ほど十分に剥ぎ取り、それによって、このものは腫瘍細胞に接着し、この結合ポリリジンは、診断剤または治療剤を結合しているので、この腫瘍細胞に作用し、その腫瘍化または細胞毒性治療を可能にする。

高度にアミノ化したアミノデキストランをポリリジンとして作用させたり、上に論じたような短いオリゴマー基質リンカーで置換してもよい。このものは、ポリリジン同様、細胞膜やその他の組織に対して「ねばつく」。その他のポリペプチド、または、高度にアミノ化したポリマーも、同様に粗体として、基質のコーティングおよび可溶化に機能することができる。実際には、アミノ化は、負荷した粗体の標的にとって必須ではない。なぜなら、ある粗体と1種以上の切断剤および/または治療剤との接合体から好都合な分配をもたらす官能性は、それが何であれ、基質オリゴマーを可溶化することによって、または、小さな基質分子を可溶化するだけで、マスクすることができるからである。すなわち、得られた可溶性の接合体は、血液または別の液体と液体中で容易に循環するが、標的部位を覆す液体中では、被覆分子が抗体-酵素接合体に局所する酵素の作用によって切断されることにより、難溶性となる、そのように可溶化が

行なわれる。

負荷された粗体ポリマーの、「被覆性」可溶化基質またはオリゴマーに対する割合は、標的部位の性質や成分の特性によって異なる。もしポリリジンもしくはそれに相当する構造をもつ化合物を粗体として用いる場合、オリゴデキストランによる被覆は、質量で約1:10から約100:1のデキストラン:ポリリジンの割合で、好みしくは約1:1から約10:1の割合で、さらに好みしくは約3:1から約7:1の割合で行なうのが有利である。一つの例は、MW約1,500ダルトンのポリリジンで、これを、それぞれMW約15,000ダルトンの約3-7個のデキストランオリゴマーで被覆したものである。

例えば、Goldenberg、アメリカ国特許第4,424,866号に開示されている通り、接合体と複合体形成してマクロファージや膜内皮系による複合体の取り込み速度が増進するように第二の抗体を使用することによって、診断剤または治療剤が局在もしくは付着するのに十分な時間の経過した後に、抗体-酵素接合体および/または基質-酵素接合体のクリアランスを増進することができるなら好都合であろう。このような第二の抗体クリアランスのための最適時間は、そのいずれかの接合体上の標識

特表平5-501543 (15)

の助けを借りて固定でき、これによって、標的部位における抗体-酵素接合体の局在の程度、および／または、標的部位における薬剤付着の程度、および、非ターゲティング接合体の生体内分布が監視できる。

試薬は、ヒトの治療および診断用に、2重の注射剤(*i.e.* *injectable reagent*)^(a)として供給されると好都合である。第1の注射剤は酵素に結合された抗体もしくは抗体フラグメントの有効量を、医薬的に受容可能な注射用ベヒクルに、好ましくは、生理的pHと濃度を持つ磷酸緩衝食塩水液(PBS)に溶解させたものである。第2の注射剤は、少なくとも1種の診断剤もしくは治療剤に結合された可溶性基質の有効量を、医薬的に受容可能な注射用ベヒクル(一般的には、第1の剤に使用されるものと同じもの)に溶解させたものである。この注射剤は、特にヒトへの使用を意図したものである場合、滅菌性のものであるのが好ましい。

試薬はまた、2個の適当な容器を用い、標的部位への抗体ターゲティングのための治療用もしくは診断用キットとして供給されると好都合である。第1の容器は、酵素に共存的に結合した抗体または抗体フラグメントの有効量を含む。第2の容器は、

少なくとも1種の治療剤もしくは診断剤に結合した可溶性基質の有効量を含む。試薬は、保存安定性を図るために液状乾燥してもよいし、または、溶液の形で、必要に応じて選別の保存剤、安定化剤などを含ませて供給してもよい。このようなキットに入れるその他の任意成分としては、通常、バッファー、保護試薬、放射性同位元素、常温性化合物、クリアランス助長のための第2の抗体、通常の注射器、カラン、瓶などがある。

本発明の方法は、通常、非経口的注入によって実施される。種々の非経口注入、例えば、体腔内(例えば、腹腔内)、静注、動注、胸膜内、硬膜内、筋注、リンパ管内、局所動注、局所胸膜内、皮下、カテーテル灌流などであるが、これらに限界はない。

癌の固形化および／または治療としては、静注、動注、胸膜内投与が、通常、肺、腎、白血病に使用される。腹腔内投与は、非癌腫瘍に好都合である。硬膜内投与は、脳腫瘍や白血病に有利である。皮下投与は、ホジキン病、リンフォーマ、肺癌に有利である。カテーテル灌流は、肺や胸膜の転移癌、肝臓の芽球性癌に有効である。胸膜内投与は、肺や胸膜の病変に有効である。

上記は、本発明の抗体-酵素接合体および基質-治療剤もしくは診断剤接合体を投与する場合の一般的な方法を示したものである。2種の異なる接合体の投与法は、両接合体のクリアランス経路と生体内分布は一般に異なるために、同じでなくともよいことは了知されるであろう。例えば、抗体-酵素接合体の腹腔内投与は、非癌腫瘍を標的にするには有利であるが、固形化のためには、放射性同位元素-基質接合体を静脈投与するのが望ましい。なぜなら、後者の場合、付着濃度をコントロールしやすいし、また、クリアランス速度を監視しやすいからである。

抗体-酵素接合体は一般に、PBSに、好ましくは、特にヒトに使用する場合には、滅菌液に溶解した水溶液として投与される。抗体-酵素接合体約30 μg～約500 μgの投与量を、單回投与もしくは分割投与で投与するのが好都合である。もちろん、これより少ない投与量または多い投与量でも、特定の症例に対しては適正であり得る。次のような場合には、用量を減らしたり、および／または、他の動物種からの抗体および／または低アレルギー性抗体を用いることが必要になることがある。すなわち、特に治療のために患者の感受性を下げたり、特に、

治療処方として、または、さらにそれに加えて診断法のために、繰り返し投与が必要な場合である。このような注意的処置が必要な場合の指針としては、ヒト抗体マウス抗体(HAMA)産生の増加がある。これは、イムノアッセーを用いて定量できる。

IgG抗体が標的部位に局在し、その哺乳類の循環系から実質的に除去され、基質-薬剤接合体投与の懸念が整うまでは、通常、約2から14日、好ましくは5から14日かかる。 $T_{1/2}$ および $T_{1/2}'$ 抗体フラグメントの対応の局在化およびクリアランス時間は、約2から7日、好ましくは4から7日であり、また、 $T_{1/2}$ および $T_{1/2}'$ 抗体フラグメントにおいては、約1から3日、好ましくは3日である。その他の抗体は、標的部位に局在するのに別の時間枠を必要とするかもしれない。また、上記の時間枠も、結合された酵素の存在の影響を受けることがあるかもしれない。ここでも付記するが、抗体-酵素接合体を保護すれば、それによって、局在化およびクリアランスを監視することができる。

IgGは、普通、肝臓で代謝され、僅かに消化系で代謝される。 $T_{1/2}$ および $T_{1/2}'$ は、普通、主に腎臓で代謝されるが、肝臓でも、消化系でも代謝される。 $T_{1/2}$ および $T_{1/2}'$ は、腎

道、主に腎臓で代謝されるが、肝臓でも、消化系でも代謝される。

通常、基質-酵素接合体の投与前には、抗体-酵素接合体投与量の、少なくとも約1,000%が標的部位に局在していなければならぬ。この接合体のターゲティング効率が高ければ高いほど、このパーセントが高くなり、低い投与量を与えるべきことになる。

このことから、抗体-酵素接合体有効量とは、その接合体を標的部位の抗原にターゲティングするのに十分な量であって、それによって十分な量の酵素を結合させ、それによって十分な量の可溶性基質-薬剤接合体を産物に変換し、その結果、薬剤のは断もしくは治療に有効な量の蓄積を標的部位にもたらすような量である。

基質-治療剤または診断剤接合体は、一般に、PBS中の水溶液として投与される。この場合も、ヒトへの使用を意図する場合は、試験液とする。基質-薬剤接合体は、抗体-酵素接合体が標的部位に局在し、哺乳類の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過して後、投与される。

熱中性子活性化治療用に、ホウ素付加因子負荷担体の接合体

を用いる場合も、通常、同様にして行なう。すなわち、非ターゲティング基質-薬剤接合体が除去されるのを待って、始めて中性子照射を実施するのが好適である。このようなクリアランスは、例えば、アメリカ国特許第4,416,141号からも分かるように、第2の抗体を用いることによって加速することができる。

基質-薬剤接合体の有効量とは、その薬剤の有効量を標的部位に送達するのに十分な量であり、また、基質が酵素によってある形の産物に変換され、その産物を標的部位に蓄積させるような基質量である。治療剤または診断剤の有効量とは、標的部位の治療、診断に十分な量である。

もしシンチグラフ画像を実施する場合には、基質-薬剤接合体は、基質に結合した放射性標識を含むだろう。これは、放射性金属のキレートでも、直接ヨード化もしくは金属化した化合物であってもよい。適当なガンマ放射同位元素としては、¹¹¹I, ¹¹³I, ¹²³I, ^{99m}Tc, ¹¹¹Sn, ⁶⁷Gaが挙げられる。抗体は標的部位の抗原に結合するものであり、酵素は基質-薬剤接合体をある産物に変換するものであるが、その産物は、画像化を可能にするほど十分な量標的部位に蓄積するものである。一旦、十分な同位元素が標的部位に付着したならば、走査を、通常の平

面型ガンマカメラおよび/またはSPECTガンマカメラのいずれかによって行うか、あるいは、外部的もしくは内部的に使用される手動操作型ガンマプローブによって実施し、腫瘍、感染の生物学的微小位置、心筋梗塞、動脈硬化ブラーク、または、その他の標的部位の位置を特定する。通常、シンチグラムは、1個以上のウインドウを持つガンマ画像カメラによって撮影する。これは、⁵⁰⁻⁵⁰⁰keV範囲のエネルギーの検出に用いられる。高エネルギーーベークもしくはポジトロン放射を伴う放射性同位元素を用いる場合、適当な検出器を備えた画像カメラを使用しなければならない。これらはすべて、この分野においては過例のことである。

一例として、ポリリジンオリゴマーを、スクシンイミダゾロ-イソチオシアネートベンゾエートトリニカー（アメリカ国特許第4,680,331号）を用いて、複数のアミノメチル-DTPAキレート剤に結合させ、次に得られた化合物を、優やかに酸化させ複数のデキストランオリゴマーと反応させ、次にそれを、水素化ホウ素で安定化させる。患者、例えば患者に、抗腫瘍抗体とデキストラナーゼ酵素との接合体を注入し、その接合体の局在と、非ターゲティング接合体のクリアランスのために7日を

かける。次に、この基質-キレート接合体を、PBS中のろ過試験インジウム-111イオンを用いて荷電し、患者に注入する。標的の蓄積は、約3時間以内に観察され、バックグラウンド標識のクリアランスは、約1.2-2.4時間でほぼ完了したので、この時点での画像化を実施する。

磁気共鳴画像（MRI）も、シンチグラフィー画像と同様の方法で実施するが、画像化剤は、放射性同位元素ではなく、MRI増強物質を含む。磁気共鳴現象は、シンチグラフィーとは別の原理で動作すると理解される。通常、発生した信号は、画像化される領域における水分子の水素原子核内電子の磁気モーメントの緩和時間と相関する。磁気共鳴増強剤は、緩和速度を増し、それによって、画像化剤が蓄積する領域の水分子と、体内のそれ以外の部分の水分子との間のコントラストを増す。しかしながら、この画像化剤の作用は、¹¹³Iの両方を増すべきであり、前者はコントラストの増加を招く、後者はコントラストの減少を招く。したがって、この現象は、濃度依存性であって、通常、ある常磁性物質について、最大効率に対する至適濃度が存在する。この至適濃度は、用いる特定の薬物、画像部位、画像方式、すなわち、スピニーエコー、緩和-

特表平-501543 (17)

回復、逆転-回復の各方式や、その他の種々の強力に T_1 依存性もしくは T_2 依存性の画像技術、薬物を溶解もしくは遮断する溶媒の組成、によって異なる。これらの因子およびその相対的重要性は、本分野においては既知のものである。例えば、*Pratt, Scientific American, 245:71 (1981)*, 本件ら, *Appl. J. Radiol., 141:120 (1981)* を参照せよ。

MRI画像増強に有効な化合物の例としては、常磁性 Cr(III), Fe(III), Mn(III), Ti(III), Fe(IV), Mn(II), Cr(III), Co(III), Fe(II), Cr(II), Mn(II), Ti(III) および Ti(IV) イオンもしくは基 (例えば、ニトロキシド基) が挙げられる。これらは、イオン用の常磁性イオンキレート剤、または、基付加因子 (radical adduct) 用のリンカーを担持する基質に結合される。磁気共鳴画像増強剤は、通常用いられ、患者の安全性、装置の設計に抵抗しない磁場強度において、外部カメラによって検出できるほど十分な量として存在しなければならない。このような薬物に対する条件は、本分野においては、溶媒中の水分子に対して作用するものについてよく知られており、特に、*Pratt* (上掲) および本件ら (上掲) に開示されている。

磁気共鳴画像 (MRI) においても、シンチグラフィーに用いたものと同じ方法が用いられる。前の例では、高コントラストの MRI 増強を実現するためには、多数の常磁性イオンを標的部位に送達するのが望ましいので、ポリリジンに多量のキレート剤を負荷し、比較的大量の抗体-酵素複合体と基質-キレート複合体を投与し、これによって、高濃度の常磁性イオンを標的部位に付着させる。

本発明の治療法は、放射性同位元素、例えば ^{75}Se もしくは ^{131}I (これは局創化と治療の両方に用いることができるが、投与量に依存する) の治療有効量を、または、癌用にアドリアマイシン、感染用にゲンタマイシンなどの薬剤を、または、ポリ-IC のような免疫調節物質を、または、アメリカヤマゴボウ由来ミトゲンのような生物活性を、基質に結合し、その薬剤の有効量を標的部位に付着することによって達成することができる。本発明の治療法はまた、1 個以上のホウ素-10 付加因子を基質に結合し、一旦このホウ素-10 が標的部位、例えば腫瘍に付着したならば、外部から熱中性子照射をこの腫瘍に施し、その感熱性を破壊することによっても実現することができる。ホウ素-10 複合体には、放射性同位元素キレートで標識

してもよい。こうすれば、十分なホウ素付加因子が標的部位に局在したこと、および、非ターゲティングホウ素-10 のほとんど全てが循環系を離脱したことを、中性子照射の前に、確かめることができる。

基質-薬剤複合体の用量単位は、多くの因子に左右されるが、その因子のそれぞれを、用量測定値 (dosimetric) が最適値を示すように、比較的単純なやり方で定量することができる。最初の用量測定に当たっては、放射標識基質-薬剤複合体 (もし薬剤そのものが放射性同位元素でない場合) を用いて、標的部位における薬剤の付着量、付着速度、クリアランス速度、非ターゲティング複合体の生体内分布を定量するのが便利である。標的部位に局在する酵素の量を推定するのに、標識抗体-酵素複合体を用いるのも、用量測定値分析にとって有効である。

一般には必ず動物モデルを用いて用量測定試験を実施し、ついで可能ならば、一連の臨床試験を実施する必要がある。これは、基質-薬剤複合体の至適用量を、部位の至近性 (accessibility) 、投与法、酵素の代謝回転数、部位に対する薬剤の所用量、非ターゲティング (non-targeted) 複合体のクリアランス速度の関数として、知るためである。この關係は予

測がつくし、また、至適化のための方針も、臨床家の日常技術の範囲内にある。

これ以上細部にわたって説明しなくとも、当業者であれば、前述の説明を用いて、本発明を十分に利用することは可能であると考えられる。したがって、下記の個々の好ましい具体例は単に例示として表示されるものであって、いかなる意味でも本開示のその他の部分に対して選択的に作用するものではない。下記の実施例では、温度はすべて、補正無しの氏氏で表したものであり、また、特に断わらない限り、部およびパーセントはすべて重量に基づくものである。

実施例 1

メトトレキセート/アミノデキストラン複合体の調製

(a) メトトレキセートの活性化

乾燥した反応瓶に、1 ml の無水 DMF に溶解した (5.1 mg) のメトトレキセート (0.1 mmol, 5.1 mg) を、注射器で入れた。150 μl の無水 DMF に溶解した N-ヒドロキシスルシンイミド (23 mg, 0.2 mmol, 5.1 mg) と、750 μl の無水 DMF に溶解した 1,3-ジシクロヘキシルカルボニミド (41.5 mg, 0.2 mmol, 5.1 mg) をさらに添加した。反応混合物を、暗所下、室

特表平5-501543 (18)

温で、18時間、脱水条件下に搅拌した。白色沈澱を遠心し、透明溶液を密栓瓶に入れ、-20度で保存した。

(b) アミノデキストランとの反応

アミノデキストラン (10mg , 2.5×10^{-4} mol) を、2mlのPBS, pH 7, 2に溶解した。活性化MTX (125×10^{-4} mol) を徐々に加えた。溶液を、室温で、5時間搅拌し、セファデックスG-25カラムで精製した。ガイドボリュームを集め、さらに、反応バッファーに対して透析した。凍結乾燥後、2.1mgの生成物を得た (収率21%)。メトトレキセートの取り込み量は、370nmでの吸収により、38メトトレキセート/デキストランであると決定された。

実施例2

キレート剤-ポリリジン/デキストラン接合体の調製

ポリリジン (MW 15,000) を、このポリリジンに平均5個のDTPAを結合させるに十分な量の、アミノメチル-DTPAのスクシニイミジルヨイソチオシアニートベンゾエート誘導体¹⁰ (スクシニイミジルベンゾエートが、チオウレア結合により、DTPAに結合したもの) と反応させる。得られた生成物を、1個のデキストラン当り約2個のアルデヒド基を生ずるの

に十分な程度に過ヨウ素酸塩であらかじめ軽く酸化したデキストランオリゴマー (MW 1,500) と反応させる。この反応を、ポリリジン-DTPA上に約3-5個のデキストラン単位を負荷するのに十分な量で行なう。さらに、水素化ホウ素で安定化し、Sc¹¹¹塩基結合と残存アルデヒド基を還元する。

実施例3

エビルビシン-グルクロニド接合体の調製

エビルビシンを、数週間に亘って、ウマに静注する。尿を集め、尿をイオン交換クロマトグラフィーにかけてエビルビシン・グルクロニドを単離し、さらに、カラムクロマトグラフィーおよび/またはHPLCによって精製する。

実施例4

抗体-酵素接合体の調製

(A) 実質的に单一結合 (monoclonal antibody) した酵素-抗体接合物は、次のようにして調製される。すなわち、抗CEA IgGの炭水化物部分を過ヨウ素酸塩で軽く酸化し、次に、この酸化IgGをデキストラナーゼ (Dextranase, 異由来, *Vertebrates Biological Corp., Freehold, NJ*) の希釈液に接触させて抗体-酵素接合体を生成し、次に、これを、過ヨウ

り、水素化ホウ素により安定化する。この接合体は、通常注により、I-131によって放射標識することができる。

(B) 上記Aと同様にして、抗白血球IgGをグルクロニダーゼ (牛肝臓由来, *Vertebrates*) に結合する。

実施例5

肺癌の治療

右肺の小細胞癌を持つヒト患者に、PBSに溶解した抗CEA IgG/デキストラナーゼ接合体¹¹を含む、試薬性、発熱性物質非含有培液を静注した。この溶液は、この実施例4 (A) にしたがって調製され、I-131で標識されている。5日後、接合体は肺に十分局在し、患者の循環系からはほとんど除去された。これは、毎日、シンチグラフィー検査を行って確認した。

MTX/アミノデキストランの、試薬、発熱性物質非含有PBS培液 (実施例1に準じて調製し、白血球接合体¹¹を含む) を、次の4日間毎日静注した。その後I-131-抗CEA IgGを用いる放射免疫検出により、腫瘍が有意に減少していることが分かった。

実施例6

リンパ腫の治療

リンパ腫を患うヒト患者に、抗リンパ腫IgG-グルクロニダーゼ接合体¹²を含有する滅菌、発熱性物質非含有PBS培液を静注した。この接合体は、実施例4 (b) にしたがって調製され、I-131で標識されている。ガンマ起因によって決定されるように、6日後、この接合体は、標的部位に十分局在し、循環系からほとんど除去されていた。

次に、患者に、10mgのエビルビシン・グルクロニドを含む、試薬、発熱性物質非含有PBS培液を静注した。この溶液は、実施例3にしたがって調製されたものであり、また静注は、次の4日間毎日行なった。その後、放射免疫検出により、リンパ腫は有意に減少していることが分かった。

実施例7

腫瘍放射免疫検出

直腸癌のヒト患者に、抗CEA-IgG/デキストラナーゼ接合体5mgを含む、試薬、発熱性物質非含有PBS培液を静注した。この接合体は、実施例4 (A) に従って調製された。7日後、患者に、I-111標識ポリリジン-DTPA/デキスト

ラン接合体 $5\text{-}6\text{-}7$ を含む、滅菌、発熱性物質非含有 PBS 液被を静注した。この接合体は実施例 2 に従って調製され、 $1\text{-}1\text{-}1$ が負荷されている。24時間後、シンチグラフィー画像において、腫瘍部位に、十分量の放射同位元素の蓄積が見られた。

実施例 8

癌の MRI 図象化

上行結緒直腸のヒト患者に、抗 CEA - IgG / デキストラーナー接合体 $5\text{-}6\text{-}7$ を含む、滅菌、発熱性物質非含有 PBS 液被を静注した。この接合体は、実施例 4 (A) に従って調製された。7日後、患者に、 $64\text{-}1\text{-}1$ 負荷ポリリジン-DTPA / デキストラーナー接合体 $5\text{-}6\text{-}7$ を含む、滅菌、発熱性物質非含有 PBS 液被を静注した。この複合体は、実施例 2 に従って調製された。さらに 2 日後、MRI 図像を撮影したところ、腫瘍像が示され、それは周囲の組織と十分に区別された。

前記の実施例において用いられた、一般的、特定期に記載された本発明の反応剤および/または操作条件を置換して組り替しても、同様の成績を収めることができた。

前記の記載事項から、当業者であれば、本発明の本質的な特

徴を確認することは容易であり、その思想や範囲から逸脱することなしに、本発明に様々な変更や修正を加えて各種の用法、条件に合うように変えることは可能である。

補正書の写し (翻訳文) 提出書 (特許法第 11(条の 1))

平成 4 年 6 月 1 日

特許庁長官 漢 元 旦 殿



1. 特許出願の表示 PCT/US 89/05441

2. 発明の名称 診断薬または治療薬の抗体ターゲティング

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ニューヨーク市、ウォーレン、シティー、エヌ・411、マウント・ペテル・ロード、150

名称 イムノメディックス・インコーポレイテッド

4. 代理人 東京都新宿区新宿 1 丁目 1 番 14 号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 3354-8521
(E140) 弁理士 川口 健一 (登録番号 125-150)
(ほか 4 名)

5. 補正書の提出年月日 1991 年 10 月 3 日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文



1 頁

請求の範囲

1. 診断薬または治療薬を標的部位にターゲティングする方法であって、

(a) 標的部位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供するために有効な量の抗体-酵素接合体を哺乳動物に非経口的に注入する段階、但し、前記抗体は標的部位に存在する少なくとも 1 つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記抗体-酵素接合体が標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記部位に付着するのに十分な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって交換されて少なくとも 1 個の診断薬または治療薬を含む複合物を形成することが可能であり、前記複合物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能とし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも 1 つの前記診断薬または治療薬に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、

前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う
標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる
量では内在しない。

前記皮膚を含むすることを特徴とする方法。

2. 前記抗体-酵素接合体中の抗体が、腫瘍、感染もしくは
寄生虫、フィブリリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化plaques、非
癌性細胞の損傷部位、または、傷害を受けた正常細胞の損
傷部位によって産生されるかまたはそれらに関連する抗原
に特異的に結合する、請求項1に記載の方法。

3. 前記抗体-酵素接合体中の前記酵素が、プロテアーゼ、
グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エステラーゼで
ある、請求項1に記載の方法。

4. 前記酵素が、デキストラナーゼ、セルラーゼ、または、
グルクロニダーゼである、請求項3に記載の方法。

5. 前記薬剤が診断剤である、請求項1に記載の方法。

6. 前記薬剤が、50-500 kBq エキルギー範囲で放射するガ
ンマ放射性の放射性同位元素である、請求項5に記載の方法。

7. 前記薬剤が、磁気共鳴画像増強用の常磁性イオンである、
請求項5に記載の方法。

8. 前記薬剤が治療剤である、請求項1に記載の方法。

9. 前記薬剤が、ペーターもしくはアルファ放射性の放射
性同位元素、薬物、毒素、ホウ素付加因子、血管拡張剤、サイ
トカイン、光増感剤、または、放射線増感剤である、請求項8
に記載の方法。

10. 前記非経口注入が、体腔内、肺脈内、動脈内、腹腔内、
腎臓内、リンパ管内、筋肉内、皮膚内、皮下、または、カテーテ
ル導入経路によって実施される、請求項1に記載の方法。

11. 前記基質が低分子量化合物である、請求項1に記載の
方法。

12. 前記基質が前記薬剤のグルクロニド接合体である、請
求項1-1に記載の方法。

13. 前記基質がポリマーである、請求項1に記載の方法。

14. 前記基質が、デキストラン、アミノデキストラン、カル
ボキシメチルセルロース、または、ポリペプチドである、請
求項1-3に記載の方法。

15. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであ
り、ここに、前記基質-薬剤接合体が、非基質性アミノデキス
トランまたはポリリジン抗体を含み、この抗体に、少なくとも

1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、
この抗体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デ
キストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結
合されている、請求項1-3に記載の方法。

16. 前記基質-薬剤接合体が非基質性ポリマーを含み、こ
のポリマーに、少なくとも1つの基質オリゴマーが結合され、
このオリゴマーに、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオ
ンが結合されている、請求項1-3に記載の方法。

17. 酵素からの抗体-酵素接合体のクリアランスまたは
標的部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前
記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共
鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変さ
れている、請求項1に記載の方法。

18. 酵素からの基質-薬剤接合体のクリアランスまたは
標的部位におけるその接合体の集積をモニターするために、前
記基質-薬剤接合体がさらに、放射性同位元素、酵素共鳴画像
増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結
合のために改変されている、請求項1に記載の方法。

19. 前記哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。

20. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングする
ための、ヒトに使用するための二重滅菌注射製剤であって、

(a) 医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクル中に、標的部
位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供する
ために有効な量の抗体-酵素接合体を含有する、第1の滅菌性
注射液、但し、前記抗体は標的部位の少なくとも1つの抗原と反
応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤
接合体を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記
酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤
を含む複数を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合
体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記
酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および前記基質-酵素接
合体に關して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物に
おいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経
路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積
を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に
受容可能な滅菌性注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1及
び第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

21. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングする

ための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであつて、

(a) 標的部位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供するために有効な量の抗体-酵素接合体を含有する第1の試験容器、但し、前記抗体は、その標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-萬剤接合体を含有する第2の試験容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む產物を形成することが可能であり、前記基質-萬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-萬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-萬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記萬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない。

前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

22. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強

剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項21に記載のキット。

23. 前記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

24. 前記基質-萬剤接合体がさらに、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強剤、または、その他の基質に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

25. 使用(a)で提供される前記抗体-酵素接合体が、標的部位に存在する前記抗原に対して特異的な第1の結合部位と、酵素活性を妨害しない、前記酵素上のエピトープに対して特異的な第2の結合部位とをもつ二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントを含み、前記二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントが、前記第2の結合部位で前記酵素に非共有的に結合されて前記抗体-酵素接合体を形成する、請求項1に記載の方法。

26. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための試験注射剤であつて、

(a) 医薬的に受容可能な滅菌注射用ペヒクルに溶解された、

ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌注射液、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-萬剤接合体を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む產物を形成することが可能であり、前記基質-萬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-萬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-萬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記萬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、前記基質-萬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ペヒクルに溶解されている、前記第1と第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

27. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであつて、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、並び

に、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-萬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む產物を形成することが可能であり、前記基質-萬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-萬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-萬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記萬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

28. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項27に記載のキット。

29. 診断剤または治療剤を標的部位にターゲティングする方法であつて、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、

酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ二重特異性抗体または抗体フラグメントを提供する段階、

(b) ターゲティングに有効な量の前記抗体または抗体フラグメントを、哺乳動物に非経口的に注入する段階、

(c) 前記抗体または抗体フラグメントが標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記局在化抗体が前記酵素に結合して前記抗体-酵素複合体をその場で形成するように、前記酵素の酵素活性有効量を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、

(d) さらに、前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤複合体を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、但し、前記複合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む複合物を形成することが可能であり、前記複合体は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤複合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素複合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、前記基質-薬剤複合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非

標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防ぐ量では内在しない、前記段階を含むことを特徴とする方法。

30. 前記抗体-酵素複合体中の抗体または抗体フラグメントが、腫瘍、感染もしくは寄生虫、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化ラーク、非癌性細胞、または、傷害を受けた正常細胞の損傷関連部位、によって産生されるかまたは関連する抗原に特異的に結合する、請求項29に記載の方法。

31. 前記抗体-酵素複合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エスチラーゼである請求項29に記載の方法。

32. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1個のホウ素付加因子、萬古、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴顕像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項29に記載の方法。

33. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤複合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン抗体を含み、この抗体に、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この抗体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デ

キストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている、請求項29に記載の方法。

34. 前記哺乳動物がヒトである、請求項29に記載の方法。

35. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射製剤であって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含むする第1の滅菌注射液、但し、前記抗体または抗体フラグメントは、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されていりる；

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含むする第2の滅菌注射液、但し、前記酵素は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤複合体を含むする第3の滅菌注射液、但し、前記複合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む複合物を形成し、前記基質-薬剤複合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含

み、前記基質-酵素複合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている。

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素複合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤複合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防ぐ量では内在せず、また、前記基質-薬剤複合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1、第2および第3の注射液を含むことを特徴とする製剤。

36. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含むする第1の滅菌容器、

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含むする第2の滅菌容器、並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤

特麦平5-501543 (23)

四庫全書

結合体を含有する第3の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む底物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在しない、前記第1、第2および第3の容器を含むことを特徴とするキット。

37. 前記治癒剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射保増感剤、または、光感増感剤である、請求項36に記載のキット。

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成9年(1997)10月14日

【公表番号】特表平5-501543

【公表日】平成5年(1993)3月25日

【年通号数】

【出願番号】特願平2-508109

【国際特許分類第6版】

A61K 39/395

45/00

49/00

51/00 ADU

【F1】

A61K 39/395 C 9284-4C

45/00 8615-4C

49/00 A 9454-4C

43/00 ADU 8615-4C

手続補正書

平成8年11月26日

特許出願者 岩井義光

1. 事件の表示 平成2年特許第508109号

2. 補正をする事

事件との関係 特許出願人

名 称 ノムノンディイクス・インニ・ボレノ・アツド

3. 代理人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル

(郵便番号 160) 電話(03)3361-8623

(6200) 代理人: 月日 録

4. 補正命令の月日 月 日

5. 補正により構成する請求項の後 な

6. 補正の対象 明細書及び請求の範囲

7. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙の通り訂正する。

(2) 明細書中、第6頁第1行～第7頁第1行目に「本発明は……チットを提供する。」とあるを下記の通り訂正する。

「前記方法の1つの実施形態において、抗体-酵素複合体中の抗体は、細胞、感染細胞に寄生病原、フィブリン網内、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、非癌性細胞の癌細胞部位、または、弱化を受けた正常細胞の癌細胞部位によって産生されるまたはそれらに隣接する抗原に吸着的に結合する。別の実施形態において、抗体-酵素複合体中の前記抗体は、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ペーキー・ラクタマーゼ、エステラーゼ、デキストラーゼ、または、セルラーゼである。

前記方法の別の実施形態において、蛋白は酵素剤、例えばD-500 L-パーエネルギー電離で放射するガムマー放射性の放射性同位元素である。前記酵剤が、電気共鳴吸収強度の電離性イオンであってもよい。

前記方法の別の実施形態において、酵素は過酸剤、例えばペーパーもしくはアルカーフィー放射性の放射性同位元素、蛋白、酵素、ホウ素封鎖因子、蛋白質活性、サイトカイン、光触感剤、または、放射線増感剤である。

前記方法の別の実施形態において、前記非特異注入は、体腔内、肺臓内、財脳内、頭蓋内、リンパ管内、肺内、骨髄内、皮下、または、カテーテル灌流経路によって実施される。

前記方法の別の実施形態において、蛋白が長分子量化合物、例えば前記表1のグルクロニド複合体または前記表2のポリマー複合体、デキストラン、アミノデキストラン、カルボキシメチルガルロース、または、ポリベグチドである。前記蛋白がポリマーである場合、前記蛋白は、デキストラーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記抗原-酵素複合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン結合を含み、この組合に、少なくとも1つの前記蛋白分子またはイオンが結合されており、さらには、この組合が、前記蛋白の基質である少なくとも1つのカルボキシメチルセロースオリゴマーに結合されている。前記蛋白が基質-酵素複合体である場合、前記蛋白-酵素複合体は非常

質性ポリマーを含み、このポリマーに、少なくとも1つの品質オリゴマーが結合され、このオリゴマーに、少なくとも1つの前記変形分子またはイオンが結合されている。

前記方法の別の実施形態において、該蛋白からの抗体-蛋白結合体のクリアランスまたは他の部位におけるその結合体の局在をモニターするために、前記蛋白-蛋白結合体はさらに、致死性同位元素もしくは放射性同位元素を含む蛋白結合剤と結合されているか、または結合のために変形されている。該蛋白からの抗体-蛋白結合体のクリアランスまたは蛋白部位におけるその結合体の局在をモニターするために、前記蛋白-蛋白結合体はさらに、放射性同位元素、放射共役蛋白結合剤、または、その他の蛋白質に結合されているか、または結合のために変形されている。

本発明は他の部位に治療剤または診断剤をターゲティングするため、ヒトの結合または治療に使用するためのチャットに係り、前記チャットは

(a) 治療部位に局在させるために、かつ、前記部位に治疗活性を提供するための有効な量の抗体-蛋白結合体を含むする第1の試験装置、但し、前記抗体は、その他の部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付けるために有効な量の可溶性基質-蛋白結合体を含むする第2の試験装置、但し、前記結合体は前記試験によって発現された少なくとも1つの診断または治療剤を含む蛋白を形成することが可能であり、前記蛋白-蛋白結合体は、少なくとも1つの診断または治療剤または治療剤と結合した、前記蛋白の基質を含み、ここに、前記蛋白および、前記蛋白-蛋白結合体にに関して同様の活性を持つ蛋白のいずれもが、蛋白活性において、前記蛋白-蛋白結合体の投与部位または生体内分布経路に心臓血管部位に、前記蛋白のターゲティングおよび活性を妨げる量では内在しない。

前記第1および第2の装置を含むことを特徴とする。

前記チャットにおける治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、蛋白、蛋白、放射性同位元素、放射性共鳴素と結合剤、蛋白質剤、サイトカイン、放射線治療剤、または、光活性剤である。前記チャットにおける別の実施形態において、前記抗体-蛋白結合体はさらに、放射性同位元素もしくは蛋白質剤と結合された増強剤に結合されているか、または結合のために変形されている。前記チャット

の別の実施形態において、前記蛋白-蛋白結合体はさらに、放射性同位元素、蛋白質剤と増強剤、または、その他の導葉に結合されているか、または結合のために変形されている。

前記方法の別の実施形態において、前記蛋白-蛋白結合体は、他の部位に存在する前記蛋白にに対して特異的な第1の結合部位と、前記活性を妨げない、前記蛋白上のニビトープに対して特異的な第2の結合部位とをもつ二重性蛋白質もしくは抗体フラグメントを含み、前記二重性蛋白質もしくは抗体フラグメントが、前記第2の結合部位に前記蛋白に非共役的に結合されて前記蛋白-蛋白結合体を形成する。

本発明は他の部位に治療剤または診断剤をターゲティングするため、ヒトに使用するための被覆性抗原剤に係り、前記蛋白-蛋白結合体は

(a) 医療的又は诊断可能な疾患部位にペリカルに投与された、ターゲティングおよび被覆性抗原に有効な量の、抗体-蛋白結合体を含むする第1の試験装置、並びに、

(b) 前記部位に付けるのに有効な量の可溶性基質-蛋白結合体を含むする第2の試験装置、但し、前記結合体は前記試験によって発現された少なくとも1つの診断または治療剤または治療剤と結合した、前記蛋白の基質を含み、ここに、前記蛋白および、前記蛋白-蛋白結合体にに関して同様の活性を持つ蛋白のいずれもが、蛋白活性において、前記蛋白-蛋白結合体の投与部位または生体内分布経路に心臓血管部位に、前記蛋白のターゲティングおよび活性を妨げる量では内在せず、前記蛋白-蛋白結合体は、医療的に安妥可能な試験装置ペリカルに溶解されている、前記第1と第2の試験装置を含むことを特徴とする。

本発明は他の部位に治療剤または診断剤をターゲティングするため、ヒトの診断または治療に使用するためのチャットに係り、前記チャットは

(a) ターゲティングおよび被覆性抗原に有効な量の、抗体-蛋白結合体を含むする第1の試験装置、並びに、

(b) 前記部位に付けるのに有効な量の可溶性基質-蛋白結合体を含むする第2の試験装置、但し、前記結合体は前記試験によって発現された少なくとも1

つの基質または治療剤を含む化合物を形成することが可能であり、前記蛋白-蛋白結合体は、少なくとも1つの診断または治療剤に結合した、前記蛋白の基質を含み、ここに、前記蛋白および、前記蛋白-蛋白結合体にに関して同様の活性を持つ蛋白のいずれもが、ヒトにおいて、前記蛋白-蛋白結合体の投与部位または生体内分布経路に心臓血管部位に、前記蛋白のターゲティングおよび活性を妨げる量では内在しない、前記第1および第2の装置を含むことを特徴とする。

前記チャットにおける治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、蛋白、蛋白、放射性同位元素、放射性共鳴素と結合剤、蛋白質剤、サイトカイン、放射線治療剤、または、光活性剤である。

本発明は診断または治療剤を他の部位にターゲティングする方法に係り、前記方法は

(a) 治療部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、発現に付して特異的な第2の結合部位を持つ二重性蛋白質または抗体フラグメントを提供する装置、

(b) ターゲティングに有効な量の前記抗体または抗体フラグメントを、哺乳動物に注入する装置、

(c) 前記抗体または抗体フラグメントが治療部位に局在し、かつ、その哺乳動物の組織系から実験的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記部位に抗原が前記試験に結合して前記蛋白-蛋白結合体をその場で形成するように、前記試験の時活性を有する蛋白質を前記動物に非侵襲的に注入する装置、

(d) さらに、前記部位に付けるのに有効な量の可溶性基質-蛋白結合体を前記哺乳動物に非侵襲的に注入する装置、但し、前記結合体は前記試験によって変換されて少なくとも1つの診断または治療剤を含む化合物を形成することが可能であり、前記化合物は前記蛋白の基質に構成して有効な量の蛋白または診断を可能となし、また、前記蛋白-蛋白結合体は、少なくとも1つの診断または治療剤または治療剤に結合した、前記蛋白の基質を含み、ここに、前記蛋白および、前記蛋白-蛋白結合体にに関して同様の活性を持つ蛋白のいずれもが、前記哺乳動物において、前記蛋白-蛋白結合体の投与部位または生体内分布経路に心臓血管部位に、前記蛋白のターゲティングおよび活性を妨げる量では内在しない、前記装置を含む

ことを特徴とする。この方法の抗体-蛋白結合体中の抗体または抗体フラグメントが、蛋白、糖蛋白もしくは蛋白質抗原、フィブリリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プロテーグ、炎症細胞、または、蛋白質を受けた正常組織の蛋白質抗原、によって発現されるとまたは開発する抗原に特異的に結合する。別の実施形態において、前記抗体-蛋白結合体中の蛋白が、プロテアーゼ、アリコングレーベ、グルクロンダーゼ、ペーターラクタマーゼ、または、エスチラーゼであり、前記治療剤または診断剤は、少なくとも1個のホウ素付加因子、蛋白、蛋白、放射性同位元素、放射性共鳴素と結合剤、蛋白質剤、サイトカイン、放射性共鳴素と結合剤、または、光活性剤である。前記試験は、デスクトラナーゼまたはセラトゼであり、ここに、前記蛋白-蛋白結合体が、基質蛋白質アミノキストラーゼまたはポリリジン蛋白質を含み、この蛋白質は、少なくとも1つの前記蛋白分子またはイオンが結合されており、さらに、この抗体が、前記蛋白の基質である少なくとも1つの可溶性キラストラーゼまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている。

本発明は他の部位に治療剤または診断剤をターゲティングするため、ヒトに使用するための試験装置用剤剤と、前記蛋白-蛋白結合体は

(a) 治療部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、発現に付して特異的な第2の結合部位を持つ、ターゲティングに有効な量の二重性蛋白質または抗体フラグメントを含むする第1の試験装置、但し、前記抗体または抗体フラグメントは、医療的に安妥可能な試験装置ペリカルに溶解されている、

(b) 前記部位における医療活性に有効な量の前記蛋白質を含むする第2の試験装置、但し、前記蛋白質は、医療的に安妥可能な試験装置ペリカルに溶解されている、並びに、

(c) 前記部位に付けるのに有効な量の可溶性基質-蛋白結合体を含むする第3の試験装置、但し、前記結合体は前記蛋白質によって変換されて少なくとも1つの診断または治療剤を含む化合物を形成し、前記蛋白-蛋白結合体は、少なくとも1つの前記診断または治療剤に結合した、前記蛋白の基質を含み、前記蛋白-蛋白結合体は、医療的に安妥可能な試験装置ペリカルに溶解されている、ここに、前記蛋白および、前記蛋白-蛋白結合体に付して同様の活性を持つ蛋白のいずれもが、ヒトにおいて、前記蛋白-蛋白結合体の投与部位または生体内分

布羅諾に沿う本様の概念に、前記薬剤のターゲティングおよび荷物を妨げる量では内在せず、また、前記薬剤-導管結合体は、医療的妥容可修な導管内射用べヒカルに溶解されている、前記第1、第2および第3の注射液を含むことを特徴とする。

本明は導管内射用または溶解剤をターゲティングするため、ヒトの診断または治療に使用するためのキットに係り、前記キットは

(a) 横的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、診断に対して特異的な第2の結合部位とを行つ、ターゲティングに有効な第3の二重性抗体結合または抗体フグマを含むする第1の抗体容器、

(b) 前記部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含むする第2の酵素容器、並びに、

(c) 前記部位に付するのに有効な量の可逆性蛋白-蛋白結合体を含むする第3の結合容器、且し、前記結合体は前記酵素によって溶解されて少なくとも1つの診断または治療用を含む蛋白を形成することが可能であり、前記蛋白-蛋白結合体は、少なくとも1つの診断または治療用に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記蛋白-蛋白結合体に因して活性の活性を有する蛋白のいずれかが、ヒトにおいて、前記蛋白-蛋白結合体の投与と診断または体内分布経路に沿う本特許部位に、前記薬剤のターゲティングおよび荷物を妨げる量では内在しない、前記第1、第2および第3の容器を含むことを特徴とする。前記キットにおける溶解剤または診断剤が、少なくとも1つのホルムアルdehyde、尿素、尿酸、胱氨酸同位元素、低活性化剤、山酸鉄、セントカイン、收敛媒増感剤、または、光感増感剤である。

〔別紙〕

特許の範囲

1. (a) 哺乳動物において酵素活性に有効な量の酵素、

(b) 哺乳動物においてターゲッティングするのに有効な量の、横的部位の抗原に対して特異的な少なくとも1つの第1の結合部位と酵素に対して特異的な少なくとも1つの第2の結合部位とを有する二重性抗体結合体、および

(c) 哺乳動物において横的部位に付するのに有効な量の可逆性蛋白-蛋白結合体を含み、哺乳動物に対して(a)と(b)とを結合にまたは任意の順序で依次投与した後(c)を投与するための配合剤としての薬剤組成物であつて、前記可逆性蛋白-蛋白結合体は、有効な治療及び診断のために横的部位に溶解せらるべく酵素により酵素活性が切削されると少なくとも1個の診断剤もしくは治療剤が投与されるよう、少なくとも1個の酵素剤または治療剤と共に横的部位に溶解せられた、前記蛋白-蛋白結合体は、前記酵素-蛋白結合体の投与結果または生体内分布結果に沿う本特許部位に、前記酵素-蛋白結合体は、前記酵素-蛋白結合体の投与結果または生体内分布結果に沿う本特許部位に、前記酵素-蛋白結合体は、前記酵素-蛋白結合体を含むことを特徴とする。

2. (a) 哺乳動物においてターゲッティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素共結合体(ここにおいて、前記抗体は横的部位の抗原に特異的な少なくとも1つの第1の結合部位を有し、前記酵素はアキストラテーゼまたはセルラーゼである)、および

(c) 哺乳動物において横的部位に付するのに有効な量の可逆性蛋白-蛋白結合体を含み、哺乳動物に対して(a)と(c)を順次投与するための配合剤としての薬剤組成物であつて、前記可逆性蛋白-蛋白結合体は、有効な治療及び診断のために横的部位に溶解せらるべく酵素により酵素活性が切削されると少なくとも1個の診断剤もしくは治療剤が投与されるよう、少なくとも1個の酵素剤または治療剤と共に横的部位に溶解せられた、前記蛋白-蛋白結合体は、前記酵素-蛋白結合体の投与結果または生体内分布結果に沿う本特許部位に、前記酵素-蛋白結合体は、前記酵素-蛋白結合体を含むことを特徴とする。

3. 前記酵素が、ブロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ペーカーラクマターゼ、エスチラーゼ、デストラナーゼ、またはセルラーゼである、

請求項1に記載の組成物。

4. 前記抗体の少なくとも1つの第1の結合部位が、酵素、過酸もしくは过酸化物、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化ゾーク、非感染細胞の損傷関連部位、または、傷を受けて正常組織の損傷関連部位によって発生されるかまたはそれらに因連する抗原に特異的に結合する、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

5. 前記酵素が、ガンマ-放射性もしくしポジトロン放射性の放射性同位元素、過酸化物活性用の高活性イオン、ペーターもしくはアルファ-放射性の放射性同位元素、臭物、毒物、ホウ素付加剤、山酸鉄、セントカイン、光増感剤、または、光対照増感剤である、請求項1～4のいずれかに記載の組成物。